

ROBERTA RODRIGUES DO ESPÍRITO SANTO ABREU

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LÍTIO E TAMOXIFENO
SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
NEUROTROFINAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana
Barichello

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A162a Abreu, Roberta Rodrigues do Espírito Santo.

Avaliação dos efeitos do lítio e tamoxifeno sobre parâmetros comportamentais e neurotrofinas em modelo experimental de meningite pneumocócica / Roberta Rodrigues do Espírito Santo Abreu ; orientadora : Tatiana Barichello. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

73p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Tamoxifeno – Uso terapêutico. 2. Lítio – Uso terapêutico. 3. Meningite pneumocócica – Tratamento. 4. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 5. Fator neurotrófico derivado de célula da glia. 6. Fator de crescimento neural. 7. Memória de habituação. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Roberta Rodrigues do Espírito Santo Abreu** sob o título “**Avaliação dos efeitos do lítio e tamoxifeno sobre parâmetros comportamentais e neurotrofinas em modelo experimental de meningite pneumocócica**”, para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Criciúma, SC, 15 de dezembro de 2016.

Alexandra Zugno

Prof.ª Dra. Alexandra Toppi Zugno

Membro Relator

Ricardo

Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

Membro Interno

Fabricia

Prof.ª Dra. Fabricia Cardoso Petronilho

Membro Externo

Josiane Budni

Prof.ª Dra. Josiane Budni

Representante Legal da Orientadora

Dra. Tatiana Barichello

Josiane Budni

Prof.ª Dra. Josiane Budni

Coordenadora Adjunta do PPGCS

Folha informativa

A dissertação de mestrado foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Experimental e Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos difíceis que me tornaram mais forte e por todos os momentos de alegria que me fizeram sorrir.

À Profa. Dra. Tatiana Barichello, orientadora desta dissertação, por toda dedicação, paciência e comprometimento, por me proporcionar participação do seu grupo de pesquisa e acima de tudo poder estar ao seu lado compartilhando sua experiência profissional e seus ensinamentos.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Experimental pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho, por me auxiliarem nas dificuldades, por esclarecerem minhas dúvidas.

À minha família e meus amigos pela confiança e por estarem sempre presentes em todos os momentos que precisei dividir minha ansiedade, angústia ou alegria.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de certa forma estiveram sempre torcendo por mim, incentivando-me e confiando em meu potencial para que pudesse concluir este trabalho.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

A meningite pneumocócica é uma infecção grave do sistema nervoso central (SNC), com altas taxas de letalidade, que provoca redução do desempenho psicomotor, ligeira lentidão mental, comprometimento das funções executivas de atenção e deficiência de aprendizagem e memória. O estabilizador de humor de lítio é conhecido como um agente neuroprotetor com muitos efeitos no cérebro. O tamoxifeno é a terapia endócrina usual para o câncer de mama. Pesquisas experimentais demonstraram que o tamoxifeno desempenha papéis neuroprotetores na lesão medular, hemorragia intracerebral, isquemia cerebral e lesão cerebral hipóxico-isquêmica. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do lítio e do tamoxifeno sobre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF) e fator de crescimento neuronal (NGF) no hipocampo de animais submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. Neste estudo, os animais receberam líquido cefalorraquidiano (LCR) artificial como um placebo ou uma suspensão de *Streptococcus pneumoniae* na concentração de 5×10^9 unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Dezoito horas após a indução, todos os animais receberam ceftriaxona (100 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) durante 7 dias). A partir do terceiro ao décimo dia os animais receberam solução salina, lítio (47,5 mg/kg) ou tamoxifeno (1 mg/kg) como tratamento adjuvante e foram separados em seis grupos: controle/salina, controle/lítio, controle/tamoxifeno, meningite/salina, meningite/lítio e meningite/tamoxifeno e foram submetidos aos testes comportamentais. No teste de habituação ao campo aberto, os animais submetidos à meningite não apresentaram diferença entre as sessões de treino e teste, demonstrando comprometimento da memória. Nos grupos controle/salina, controle/lítio, controle/tamoxifeno e meningite/lítio, houve diferença demonstrando memória de habituação nestes animais. Na tarefa de esQUIVA inibitória, houve diferença entre as sessões de treino e teste nos grupos controle/salina, controle/lítio, controle/tamoxifeno e meningite/lítio, demonstrando memória aversiva de curto e longo prazo nestes grupos. Nos grupos meningite/salina e meningite/tamoxifeno, não houve diferença

entre as sessões de treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva a curto e longo prazo nestes animais. Após os testes os animais foram mortos e os hipocampus foram removidos para avaliação dos níveis de BDNF, NGF e GDNF. Os níveis de BDNF e GDNF foram restabelecidos no hipocampo dos animais tratados com lítio, no entanto, os níveis de BDNF, NGF e GDNF diminuíram no hipocampo de animais tratados com tamoxifeno. O lítio foi capaz de prevenir o comprometimento da memória e restabelecer a expressão de neurotrofinas no hipocampo em modelo experimental de meningite pneumocócica.

Palavras-chave: meningite pneumocócica, neurotrofinas, memória, lítio, tamoxifeno.

ABSTRACT

Pneumococcal meningitis is a serious infection of the central nervous system (CNS) with high fatality rates that causes reduced psychomotor performance, slight mental slowness, impairments in attention executive functions, and learning and memory deficiencies. The mood-stabilizer lithium is known as a neuroprotective agent with many effects on brain. Tamoxifen is the usual endocrine therapy for breast cancer. Experimental investigations have shown that tamoxifen plays neuroprotective roles in spinal cord injury, intracerebral hemorrhage, cerebral ischemia, and hypoxic-ischemic brain injury. The aim of this study was to investigate the effects of lithium and tamoxifen on brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), and nerve growth factor (NGF) levels in the hippocampus of animals submitted to the experimental model of pneumococcal meningitis. In this study, animals received either artificial cerebrospinal fluid as a placebo or a *Streptococcus pneumoniae* suspension at a concentration of 5×10^9 colony-forming units (CFU/mL). Eighteen hours after induction, all animals received ceftriaxone (100 mg/kg body weight given i.p. during 7 days). From the third day until the tenth day, the animals received saline, lithium (47.5 mg/kg) or tamoxifen (1 mg/kg) as adjuvant treatment and they were separated in six groups: control/saline, control/lithium, control/tamoxifen, meningitis/saline, meningitis/lithium and meningitis/tamoxifen. Ten days after meningitis induced, the animals were in the open field habituation test the animals submitted to meningitis presented no difference between the training and test sessions, demonstrating memory impairment. In the control/saline, control/lithium, control/tamoxifen and meningitis/lithium groups, there was a difference demonstrating habituation memory. In the task of inhibitory avoidance, there was a difference between training and test sessions in the control/saline, control/lithium, control/tamoxifen and meningitis/lithium groups, demonstrating short and long term aversive memory in these groups. In the meningitis/saline and meningitis/tamoxifen groups, however, there was no difference between the training and test sessions, demonstrating short and long term aversive memory impairment in these animals, after

task the animals were killed and their hippocampi were removed to evaluate the levels of BDNF, NGF, and GDNF. The BDNF and GDNF levels were restored in the hippocampus of the animals treatment with lithium, however levels of BDNF, NGF and GDNF decreased in the hippocampus of animals treated with tamoxifen. Lithium was able to prevent memory impairment and re-establish hippocampal neurotrophin expression in experimental pneumococcal meningitis.

Key words: Pneumococcal meningitis, neurotrophin, memory, lithium, tamoxifen

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia do <i>S. pneumoniae</i> no SNC: aderência, invasão e resposta do hospedeiro..	31
Figura 2: Representação da linha do tempo para a indução da meningite bacteriana, tratamento com ceftriaxona, lítio e tamoxifeno, testes comportamentais e morte dos animais.	44
Figura 3: Teste de habituação ao campo aberto..	45
Figura 4: Teste de esquiva inibitória.	46
Figura 5: Efeitos do lítio e do tamoxifeno no teste de habituação ao campo.	49
Figura 6: Efeitos do lítio e do tamoxifeno no teste comportamental de esquiva inibitória em ratos Wistar adultos 10 dias após indução de meningite pneumocócica.	49
Figura 7: Efeitos do lítio e do tamoxifeno na expressão de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite pneumocócica.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- ALS: Esclerose lateral amiotrófica (do inglês, *Amyotrophic lateral sclerosis*)
- ANOVA: Análise da Variância (do inglês, *Analysis of variance*)
- BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *Brain derived neurotrophic factor*)
- BHE: Barreira hemetoencefálica
- CNTF: Fator neurotrófico ciliar (do inglês, *Ciliary neurotrophic factor*)
- CREB: Ligação do elemento de resposta cAMP (do inglês, *Response element binding protein*)
- d-AMPH: d-anfetamina (do inglês, *d-Amphetamine*)
- DO: Densidade óptica
- EGTA: Ácido tetra acético
- ERO: Espécies reativas ao oxigênio
- ER α : Receptor de estrogênio α (do inglês, *Estrogen receptor alpha*)
- GDNF: Fator neurotrófico derivado de célula da glia (do inglês, *Glial cell-derived neurotrophic factor*)
- GP1R: Receptor sensível ao estrogênio acoplado à proteína G (do inglês, *G protein-coupled estrogen receptor 1*)
- GPI: Glicosil-fosfatidil inositol (do inglês, *Glycosyl phosphatidylinositol*)
- GSK-3 β : Glicogênio sintase quinase - 3 β (do inglês, *Glycogen synthase kinase 3B*)
- i.p: Intraperitoneal
- IgA: Imunoglobulina A protease
- IL: Interleucina
- IRAK-4: Receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (do inglês, *Interleukin receptor associated Kknase 4*)
- LCR: Líquido cefalorraquidiano
- LTD: Depressão em longo prazo (do inglês, *Long term depression*)
- LTP: Potencialização em longo prazo (do inglês, *Long term potentiation*)
- MyD88: Proteína de diferenciação mielóide 88 (do inglês, *Myeloid differentiation factor 88*)
- NF- κ B: Fator Nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear factor kappa B*)
- NGF: Fator de crescimento neuronal (do inglês, *Nerve growth factor*)
- NOD: Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
- NT-3: Neurotrofina-3
- NT-4/5: Neurotrofina-4/5

p75NTR: Receptor de neurotrofina de baixa afinidade p75 (do inglês, *p75 neurotrophic receptor*)

PAF: Fator de ativação de plaquetas (do inglês, *Platelet aggregation factor*)

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen associated molecular patterns*)

PBS: Tampão fosfato (do inglês, *Phosphate buffered saline*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês, *Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKC: Proteína quinase C (do inglês, *Protein kinase C*)

PMSF: Flúor fenilmetilsulfonil (do inglês, *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PRRs: Receptores específicos de reconhecimento padrão (do inglês, *Pattern recognition receptors*)

SINAN: Sistema de informação de agravos de notificação

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

TGF- β : Fator de crescimento transformante- β (do inglês, *Transforming growth factor beta*)

TIR: Receptor de domínio homólogo Toll-IL-1 (do inglês, *Toll/interleukin-1 receptor*)

TLRs: Receptores Toll-likes (do inglês, *Toll-like receptors*)

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*)

TRAF: Fator associado ao fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumour necrosis factor receptor-associated factor*)

TRAK: Fator de necrose tumoral quinase (do inglês, *Tumour necrosis factor receptor-associated factor kinase*)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 MENINGITE	25
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	26
1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO PNEUMOCOCO	27
1.4 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA	29
1.5 NEUROTROFINAS	31
1.5.1 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	32
1.5.2 Fator de crescimento neuronal (NGF).....	33
1.5.3 Fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF).....	34
1.6 LÍTIO.....	34
1.7 TAMOXIFENO.....	37
1.8 JUSTIFICATIVA	39
2. OBJETIVO	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. MATERIAL E MÉTODO	42
3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	42
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	42
3.3 ORGANISMO INFECTANTE	42
3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE.....	42
3.5 TRATAMENTO E MODELO EXPERIMENTAL	43
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS	44
3.6.1 Habituação ao campo aberto.....	44
3.6.2 Esquiva inibitória	45
3.7 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE BDNF, NGF E GDNF.....	46
3.8 ESTATÍSTICA.....	47
4 RESULTADOS.....	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 MENINGITE

A meningite bacteriana é uma infecção do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por uma forte inflamação das meninges e espaço subaracnóide (Grandgirard et al., 2007a), causando prejuízos neuropsicológicos e cognitivos, através de uma reação inflamatória e apoptótica (Leib et al., 1996; Koedel e Pfister, 1999; Irazuzta et al., 2005).

A grave inflamação associada à meningite bacteriana resulta em edema cerebral, vasogênico e nas meninges, eventualmente, ocorre o aumento da pressão intracraniana uma vez que os mecanismos compensatórios para o deslocamento do líquido cefalorraquidiano (LCR) foram comprimidos, herniação cerebral e infiltração local de leucócitos ou formação de abscessos, assim como pela necrose cortical e perda neuronal hipocampal (Dorsett e Liang, 2016).

A meningite bacteriana é uma infecção potencialmente fatal, em adultos, crianças e recém-nascidos, que varia de acordo com as condições socioeconômicas, estado imunológico, localização geográfica e o agente patogênico (Kim, 2010; McIntyre et al., 2012). É caracterizada por forte inflamação e danos neuronais com alta mortalidade e sequelas de longo prazo que afetam até 50% dos sobreviventes (Mook-Kanamori et al., 2011). Dentre as sequelas inclui-se déficit sensorio motor, convulsões, prejuízos no aprendizado e na memória, déficit de atenção, lentidão de resposta auditiva e cegueira (Gianinazzi et al., 2004; Hoogman et al., 2007).

O *Streptococcus pneumoniae* é um importante agente bacteriano que provoca infecções graves em seres humanos, incluindo a meningite. Este micro-organismo, comumente encontrado na nasofaringe de portadores assintomáticos, é o agente etiológico mais comum da meningite bacteriana e é responsável pela maior taxa de mortalidade e morbidade (Macedo-Ramos et al., 2016).

A invasão neurológica bacteriana pode ocorrer tanto no contexto da doença sistêmica após disseminação pela corrente sanguínea ou por extensão de uma sinusite ou otite. A colonização bacteriana do SNC também é possível através de infecções locais, má formação na dura-máter, após neurocirurgia ou trauma crânio-cervical (Sellner et al., 2010). Além disso, a propagação contígua de infecções dentárias, comunicações traumáticas ou congênitas com o meio exterior são fatores que podem provocar meningite (Dorsett e Liang, 2016).

A falta de uniformidade nos danos ocasionados gera uma dificuldade para avaliar a severidade e o grau dos prejuízos neuronais, dificultando quantificação dos danos cerebrais, especialmente em períodos imediatamente após a lesão, criando obstáculos para novas terapias eficazes no tratamento da meningite bacteriana (Sellner et al., 2010).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Estimativas apontam aproximadamente 1,2 milhões de casos de meningite, sendo responsável por um número estimado de 171.000 mortes no mundo a cada ano (Liechti et al., 2015). Apesar do aumento da disponibilidade antimicrobiana e de cuidados intensivos, a meningite bacteriana continua sendo uma significativa causa de morbidade e mortalidade, apresentando uma taxa de mortalidade mundial de 13 a 27% (Dorsett e Liang, 2016). Aproximadamente 50% dos sobreviventes apresentam graves distúrbios neurológicos e neuropsicológicos, sendo evidenciada associação, inclusive, com doenças psiquiátricas como psicose e esquizofrenia (Abrahao et al., 2005).

A incidência de meningite depende de vários fatores, tais como a faixa etária, a cobertura vacinal e outras condições predisponentes, por exemplo, imunodeficiências específicas (Mcintyre et al., 2012). Na Inglaterra e no País de Gales, *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram os patógenos mais prevalentes causadores de meningite bacteriana entre 2004 e 2011 (Okike et al., 2014).

Os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana no Brasil são *N. meningitidis* (28%), *S. pneumoniae* (16%) e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (2%), outras bactérias (23%) e bactéria não especificada (31%) (Brasil, 2014).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil, em 2014, foram confirmados 17.434 casos de meningites. Do total de casos, 34% (n = 5.848) foram registrados como etiologia bacteriana, e destas 16% dos casos foram confirmados como sendo meningite pneumocócica (n = 947) (SVS, 2014).

Na França dados revelaram uma incidência anual de meningite de 2,23 casos para 100.000 habitantes (Honda e Warren, 2009; Varon, 2009).

Infelizmente, a mortalidade e morbidade da meningite apresentam elevado custo hospitalar. Nos Estados Unidos, a meningite responde por cerca de US\$ 72 mil em internações e até US\$ 1,2 bilhões em custos hospitalares por ano (Honda e Warren, 2009). Entre os anos de 1993 e

2008, aproximadamente 66.000 pacientes foram diagnosticados com meningite, com uma incidência de 62 para 100.000 pacientes. No país entre as causas de meningite, os diagnósticos incluem meningite não especificada (60%), viral (31%), bacteriana (8%) e fúngicas (1%) (Takhar et al., 2012). A idade média de pacientes com meningite aumentou de 15 meses de idade em 1986 para 35 anos em média atualmente (Dorsett e Liang, 2016). Concomitante, após as recomendações de que todas as crianças recebessem a vacina Hib a partir dos 2 meses de idade, a incidência de meningite por Hib entre as crianças menores de 5 anos de idade declinou em mais de 99% (Takhar et al., 2012).

A incidência da meningite bacteriana é maior nos países com baixa renda do que em países desenvolvidos, sendo a taxa de letalidade de 4,5% em países desenvolvidos e de 15 a 50% em países com baixa renda (Brandt, 2010). Aproximadamente 430 milhões de pessoas vivem na área conhecida como cinturão da meningite, na África Subsaariana, que abrange desde o Senegal até Etiópia. Mesmo com o tratamento com antimicrobianos adequados, cerca de 10% dos pacientes morrem e até 20% ficam com sequelas definitivas, como perda auditiva e danos cerebrais (Brouwer et al., 2010).

1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO PNEUMOCOCO

O *S. pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva que pode ser encontrada como um organismo comensal do trato respiratório superior (Martner et al., 2008) e com menor frequência, estão distribuídas pelo corpo humano (Drijkoningen e Rohde, 2014). É considerada a principal causa de doenças como, otite média e sinusite, bacteremia e de graves doenças como pneumonia, meningite e sepse (Harvey et al., 2014). *S. pneumoniae* é o agente patogênico que com maior frequência leva à morte ou a déficits neurológicos de longa duração em comparação com outros patógenos causadores de meningite bacteriana, sendo, dano cognitivo (6,3%), doenças convulsivas (3,7%), perda auditiva (11,2%), déficits motores (8,7%) e alterações comportamentais (6,8%) as deficiências mais frequentes (Edmond et al., 2010).

São conhecidos 93 sorotipos de *S. pneumoniae* identificados de acordo com a composição de seus polissacarídeos capsulares. Diferentes sorotipos podem ter diferentes taxas de virulência, porcentagem de manifestação de doença invasiva em grupos etários diversos e distribuição geográfica (Jauneikaite et al., 2012).

Para que ocorra a colonização na nasofaringe e posterior invasão e disseminação das vias respiratórias inferiores são necessárias a expressão e a interação particular dos fatores de virulência com as células receptoras do hospedeiro (Mook-Kanamori et al., 2011) e quando o micro-organismo alcança a corrente sanguínea pode ocasionar bacteremia, chegando ao SNC (Ostergaard et al., 2004). Os agentes patogênicos podem infectar o SNC durante a bacteremia ou mais frequentemente ganham acesso direto durante os processos inflamatórios em estruturas adjacentes, por exemplo, 50% de adultos com sinais de meningite pneumocócica tinham sinais de sinusite ou otite (Kastenbauer e Pfister, 2003).

As infecções pneumocócicas são mais frequentes nos extremos de idade com existência de condições consideradas predisponentes como a asplenia anatômica ou funcional, imunodeficiência congênita ou adquirida, desnutrição, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, transplante de órgãos, diabetes mellitus, doença pulmonar crônica, insuficiência cardíaca congestiva, alcoolismo, hepatopatia crônica, talassemia, pacientes com fístula liquórica, entre outras (Mook-Kanamori et al., 2011).

O crescimento global e contínuo de cepas resistentes aos antimicrobianos transformou-se em um dos maiores desafios associados a este agente (Cottagnoud e Tauber, 2004). O *S. pneumoniae* possui vários mecanismos de patogenecidade, como cápsula de polissacarídeo, pneumolisina, hialuronidase, lipoproteínas e proteínas de superfície (Mitchell e Mitchell, 2010).

A cápsula de polissacarídeo é considerada como o fator de virulência mais importante do pneumococo, exercendo atividade antifagocitária, já que impede a célula bacteriana de interagir com os receptores das células fagocitárias do hospedeiro, mantendo o micro-organismo fora da célula (Tortora et al., 2014). A cápsula também é crucial para a colonização, impede a remoção mecânica pelo muco (Nelson e Cox, 2011) e também restringe a autólise e pode reduzir a exposição a antibióticos (Van Der Poll e Opal, 2009; Tortora et al., 2014).

A pneumolisina é uma toxina expressa por quase todas as cepas invasivas do *S. pneumoniae*, sendo responsável por ações citotóxicas e pró-inflamatórias, diminuição do batimento ciliar epitelial, ativação do sistema complemento, apoptose de células do hospedeiro e citólise (Mook-Kanamori et al., 2011). Essa toxina possui a capacidade de ligar-se a membrana do colesterol das células formando grandes poros e destruindo, assim, a integridade da membrana, levando a morte celular (Tortora et al., 2014). O papel da pneumolisina na patogênese de

infecções tem sido estudado em modelo animal usando pneumococos em que o gene para a toxina foi suprimido (Mitchell e Mitchell, 2010).

1.4 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA

Após a utilização de seus diversos mecanismos de virulência para burlar as barreiras naturais do hospedeiro, o pneumococo prende-se ao epitélio da nasofaringe através da ligação da fosforilcolina ao fator de ativação de plaquetas (PAF) ou pela ligação da proteína ligadora de colina com o receptor epitelial polimérico de imunoglobulina, posteriormente, a bactéria atravessa o endotélio por mecanismos inter e pericelular (Mook-Kanamori et al., 2011).

A entrada do pneumococo no espaço subaracnóideo após atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), através do mecanismo transcelular ou causando o rompimento das junções apertadas e atravessando por via intercelular (Barichello et al., 2012), leva à liberação de compostos pró-inflamatórios por autólise e secreção de mediadores que aumentam ainda mais a inflamação atraindo células imunes (Bohland et al., 2016). Próximo aos efeitos tóxicos direto das bactérias, a resposta imune também contribui para a lesão do SNC (Gerber e Nau, 2010). As principais células efetoras da resposta imune inata dentro do SNC são as células gliais, microglia e astrócitos residentes que exercem múltiplas funções incluindo efeitos protetores e restauradores em resposta à infecção ou lesão do SNC (Ransohoff e Brown, 2012).

Após a invasão do SNC, *S. pneumoniae* multiplica-se rapidamente e ao mesmo tempo ocorre lise bacteriana, liberando os produtos bacterianos. As células imunes são capazes de reconhecer um repertório antigênico infinito de fatores moleculares amplamente definidos a partir de agentes patogênicos tais como, ácido lipoteicóico, pneumolisina e outros fragmentos da parede celular (Mook-Kanamori et al., 2011; Barichello et al., 2012). Esses produtos bacterianos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Sellner et al., 2010), são reconhecidos pelas células do sistema imune inato (Annan et al., 2005). Os PAMPs são reconhecidos por três famílias de receptores específicos de reconhecimento padrão (PRRs), os receptores *Toll-like*s (TLRs), os adaptadores de proteínas intracelulares conhecidas como domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) e as proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos presentes na superfície das células hospedeiras (Savva e Roger, 2013). Além disso, os PRRs foram implicados no reconhecimento de uma série de moléculas

endógenas denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMP) (Hanke e Kielian, 2011).

Após o reconhecimento dos PAMPs, inicia-se a sinalização intracelular, através da transmissão de sinal do domínio citoplasmático do TLR, denominado receptor de domínio homólogo Toll-IL-1 (TIR), para o receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (IRAK-4), sendo este ativado (Cohen, 2002). A ativação de IRAK-4 é facilitada pela proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88). O IRAK-4 que estimula então, o fator associado ao fator de necrose tumoral (TRAF) e, por conseguinte, o fator associado ao fator de necrose tumoral quinase (TRAK) (Annane et al., 2005). Como resultado, o fator nuclear kappa B (NF- κ B) é liberado do citosol e se desloca para o núcleo da célula. As ações do NF- κ B incluem ligação ao DNA, ativando assim centenas de genes específicos que promovem a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina (IL) 1 β e também moléculas anti-inflamatórias como a IL-10 (Zingarelli, 2005) (figura 1).

Devido à produção de citocinas, leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados e, conseqüentemente, grandes quantidades de espécies reativas ao oxigênio (ERO) são produzidas (Kastenbauer et al., 2002). Um sulfatado de glicoproteínas presente na superfície dos leucócitos chamado, sialil-Lewisx liga-se as selectinas P e E das células endoteliais. Esta ligação torna-se mais forte quando CXCL-8 liga-se ao seu receptor específico nos neutrófilos. As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , também são necessárias para induzir a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2. A ligação entre as células endoteliais e ICAM-1 permite a passagem de neutrófilos em direção ao gradiente de substâncias quimioatraentes (Hanna e Etzioni, 2012). Levando à formação de estresse oxidativo, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, aumento da ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica, danos ao DNA, nitratação de tirosina, a ativação de metaloproteinases de matriz e produção de prostaglandina (Klein et al., 2006).

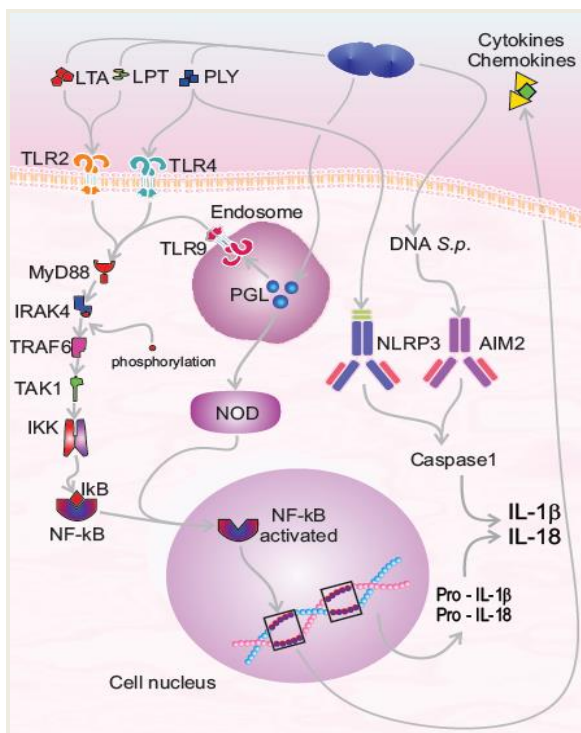


Figura 1: Fisiopatologia do *S. pneumoniae* no SNC: aderência, invasão e resposta do hospedeiro. AIM2: Ausência de melanoma 2; DNA: ácido desoxirribonucleico; IkB: Inibidor de fator nuclear kappa B; IKK: Inibidor de IkB quinase; IL-1 β : interleucina- 1 β ; IL-18: interleucina- 10; IRAK4: receptor de interleucina associado à quinase 4; LPT: fosfolipídios; LTA: ácido lipoteicoico; MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88; NF- κ B: fator nuclear kappa B; NLRP3: proteína formadora de inflammasoma 3; NOD: domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos; PGL: prostaglandina; PLY: pneumolisina; Pró- IL-1 β : Pró interleucina- 1 β ; Pró- IL-18: Pró interleucina- 18; TAK1: fator associado ao crescimento quinase 1; TLR2, 4 e 9: receptores *Toll-like* 2, 4 e 9; TRAF 6: fator associado ao fator de necrose tumoral 6. Adaptado de Barichello et al., 2012.

1.5 NEUROTROFINAS

As neurotrofinas pertencem a uma família de fatores de crescimento que desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios (Binder e Scharfman, 2004). Os fatores neurotróficos incluem geralmente a família de neurotrofina (fator de

crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5)); a família do fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF) e por último a família do fator neurotrófico ciliar (CNTF) (Harada et al., 2007).

Cada neurotrofina se liga a uma das tirosina-quinase receptora de maior afinidade (família Trk), o NGF se liga a TrkA, o BDNF e NT-4 se ligam a TrkB e NT-3 se liga a TrkC, contudo, podem se ligar também ao receptor de neurotrofina de baixa afinidade p75 (p75NTR) e induzir morte celular programada, estes efeitos opostos das neurotrofinas são importantes para a regulação de neurônios em desenvolvimento (Kimura et al., 2016).

O potencial dos fatores neurotróficos, em particular o BDNF, NGF, CNTF e o GDNF, na promoção da sobrevivência neuronal tem gerado muita esperança no seu uso terapêutico em doenças neurodegenerativas incluindo Alzheimer, Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), Parkinson e Glaucoma (Levin et al., 2011; Allen et al., 2013).

1.5.1 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é um membro das neurotrofinas e o mais difundido fator de crescimento no cérebro, exercendo efeitos na transmissão sináptica, estimulação neurogênica e parece estar envolvido em processos de plasticidade sináptica (Kimura et al., 2016). Esta neurotrofina pertence à família NGF e é amplamente expressa em todo o SNC, principalmente no hipocampo que é descrito como um importante sítio de ação do BDNF (Binder e Scharfman, 2004), exercendo os seus efeitos pró-sobrevivência ligando-se ao seu receptor TrkB e ativando as vias de sinalização envolvendo a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt, que conduz à ativação dos alvos pró-apoptóticos e da regulação da quinase por sinal extracelular, que resulta na fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB) que induz a transcrição de vários genes associados com a sobrevivência neuronal (Brunet et al., 2001; Arthur et al., 2004).

Essa neurotrofina e seu receptor TrkB relacionado à tropomiosina de alta afinidade, são amplamente expressos no cérebro adulto, onde podem estar envolvidos em neurogênese após meningite bacteriana (Tauber et al., 2005). O efeito do BDNF vem sendo pesquisado em diversas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, pois desempenha um papel fundamental na plasticidade neuronal, memória e modula os principais processos dependentes de estímulo externo, como: aprendizado, experiências e memórias (Frey et al., 2006a).

Em um estudo de Barichello et al. (2010) foi evidenciado uma correlação entre os baixos níveis de BDNF no hipocampo e a presença de déficits comportamentais em animais submetidos à meningite neonatal (Barichello et al., 2010a). A administração de BDNF exógeno mostrou ser eficaz na neuroproteção em ratos submetidos à meningite bacteriana experimental, sendo postulado que este mediador poderia estar envolvido na homeostase do cálcio neuronal, na prevenção da morte celular pela modulação de ERO e apoptose (Li et al., 2007).

Estas implicações sugerem que a neurogênese prejudicada das células estaminais neurais, pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de BDNF e que ele pode ser um potencial motivo para a regulação da neurogênese na meningite bacteriana (Lian et al., 2016).

1.5.2 Fator de crescimento neuronal (NGF)

O NGF pertence à família NGF de neurotrofinas e pode estimular o receptor TrkA e p75NTR. A estimulação destes receptores nos neurônios pode produzir efeitos opostos, nos quais a ativação de TrkA está associada à sobrevivência neuronal, enquanto que a ativação de p75NTR está implicada na apoptose neuronal (Frade et al., 1996; Nykjaer et al., 2004; Kimura et al., 2016).

Na última década, avanços foram feitos no sentido de uma melhor compreensão das ações do NGF no sistema nervoso. O NGF é uma molécula neurotrófica que possui subconjuntos simpáticos e específicos de neurônios sensoriais e está presente no cérebro (Kritas et al., 2014). A acumulação de exsudados inflamatórios no cérebro é também mediada por NGF liberado a partir de células de tecidos residentes contendo a proteína armazenada (Ricci et al., 2010). É uma das primeiras neurotrofinas relacionadas ao desenvolvimento e manutenção de populações periféricas e neuronais centrais específicas (Kimura et al., 2016).

Esta neurotrofina medeia uma série de estados inflamatórios e autoimunes em conjunto com um acúmulo aumentado de mastócitos que parecem estar envolvidos em interações neuroimunes e inflamação tecidual (Ricci et al., 2010). O NGF pode desempenhar um papel importante na conversação entre células do sistema nervoso e do sistema imunitário, demonstrando a sua função não apenas no sistema nervoso. Foi relatado que os mastócitos e o NGF têm capacidade para integrar respostas imunológicas neuro-endócrinas na fisiopatologia do SNC (Levi-Montalcini et al., 1996).

1.5.3 Fator neurotrófico derivado de célula da glia (GDNF)

O GDNF é um membro distante da superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF- β). Ele sinaliza através da formação de um complexo receptor composto por glicosil-fosfatidil inositol (GPI) ligado ao receptor GFR α 1 e do receptor transmembranar tirosina quinase (RET) (Airaksinen e Saarna, 2002). Esta neurotrofina foi originalmente identificada como um potente fator neurotrófico que promove a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos do cérebro (Kimura et al., 2016).

Embora o GDNF exerça poderosos efeitos neuroprotetores, em modelo experimental com ratos deficientes de GDNF demonstraram déficit surpreendentemente pequeno no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), no entanto, estes ratos tinham grandes déficits no sistema nervoso entérico e agenesia no rim, resultando em morte logo após o nascimento (Sanchez et al., 1996). Os efeitos neuroprotetores em neurônios sugerem que o GDNF pode ser um bom candidato terapêutico para doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson e Alzheimer (Budni et al., 2015; Kramer e Liss, 2015).

1.6 LÍLIO

O lítio é o principal tratamento de transtorno bipolar (Malhi et al., 2012) e evidências indicam que os benefícios neurobiológicos do lítio podem ir além da estabilização do humor (Forlenza et al., 2014). Em modelos experimentais e clínicos, o tratamento com lítio tem sido associado à neuroproteção, devido aos seus efeitos sobre os vários mecanismos de homeostase neuronais envolvidos na ativação das respostas neurotróficas, modulação de estresse oxidativo, cascatas inflamatórias e aumento da capacidade regulatória da função mitocondrial (Diniz e Teixeira, 2011).

Diversos estudos têm sugerido que o lítio pode ser usado no tratamento de lesões cerebrais agudas, como isquemia e de doenças neurodegenerativas crônicas (Wada et al., 2005; Caldero et al., 2010). No entanto, os mecanismos exatos dos efeitos do lítio associados à inflamação não são claramente compreendidos.

Entre as ações farmacológicas estabelecidas do lítio, a inibição da glicogênio sintase quinase -3 β (GSK-3 β) é a que tem sido mais amplamente relatada por alterar as respostas inflamatórias em diversas doenças como Alzheimer, Parkinson, meningite e sepse (Woodgett,

1990; Grimes e Jope, 2001; Nassar e Azab, 2014), além de estar envolvida na apoptose e plasticidade celular (Zhao et al., 2007).

A meningite bacteriana induz uma resposta inflamatória que tem sido bem descrita em humanos e em modelos experimentais. Esta inflamação gera uma exacerbada resposta imune com a ativação de diferentes vias de sinalização e consequente produção de citocinas, quimiocinas e ERO, nitrogênio e ativação microglial (Mook-Kanamori et al., 2011). No entanto a resposta inflamatória excessiva pode ter efeitos deletérios sobre a plasticidade neuronal, comportamento e cognição (Hu et al.; Barichello et al., 2013a; Barichello et al., 2013b).

Em 2000, Hoeflich et al. demonstraram uma forte evidência da relação entre a ativação de GSK-3 β e inflamação. Eles descobriram que a GSK-3 β facilita a atividade do NF- κ B resultando em um aumento da resposta inflamatória em camundongos (Hoeflich et al., 2000). O NF- κ B é um importante regulador da transcrição de uma variedade de genes envolvidos na resposta inflamatória, imunidade inata e adaptativa, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular em organismos (Mitchell et al., 2016).

Muitos estudos subsequentes confirmaram as conclusões de Hoeflich que mostraram que a inibição de GSK-3 β por lítio levou a redução da produção de mediadores pró-inflamatórios em várias condições experimentais. Martin et al. demonstraram que a inibição de GSK-3 β por lítio levou à diminuição da produção de TNF- α e IL-6 enquanto que aumentou os níveis de IL-10 em monócitos de camundongos após injeção de LPS (Martin et al., 2005). Da mesma forma, diminuiu a mortalidade, a ativação de NF- κ B e a secreção de TNF- α induzida por LPS em camundongos (Zhang et al., 2009). Em modelo animal de mania, foi observado um aumento de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 no córtex pré-frontal e estriado e o tratamento com lítio reverteu esse aumento de citocinas (Valvassori et al., 2015). Inibidores de GSK3, como o lítio, foram apontados como medicamentos anti-inflamatórios eficazes, reduzindo em torno de 67 a 90% a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β por microglia, astrócitos, monócitos e outras células do sistema imunológico em cultura de células estimuladas com LPS (Yuskaitis e Jope, 2009; Turnquist et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado que estabilizadores de humor, como o lítio, também exercem efeitos neurotróficos pela ativação do promotor IV do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), elevando os níveis dessa neurotrofina em estruturas cerebrais (Frey et al., 2006a; Yasuda et al., 2009). O BDNF é importante para a neurogênese, diferenciação e sobrevivência neuronal. Essa neurotrofina é expressa em

grande quantidade no cérebro, principalmente, em áreas que estão ligadas a cognição e comportamento emocional como o hipocampo e a amígdala (Huang et al., 2008; Sen et al., 2008). Em um estudo de Barichello et al. foi evidenciado uma correlação entre os baixos níveis de BDNF e a presença de déficits comportamentais em ratos submetidos à meningite (Barichello et al., 2010a). A utilização de BDNF exógeno mostrou ser eficaz na neuroproteção em ratos submetidos à meningite bacteriana experimental, sendo postulado que este mediador poderia estar envolvido na homeostase do cálcio neuronal, na prevenção da morte celular pela modulação de ERO e por apoptose (Grandgirard e Leib, 2006; Li et al., 2007). O lítio também tem sido relacionado com o aumento do fator de crescimento neural (NGF) no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala em dano por traumatismo craniano (Leeds et al., 2014a).

Outro alvo de ação do lítio é a proteína quinase C (PKC). A inibição da PKC tem sido sugerida como um dos mecanismos dos estabilizadores do humor de grande importância (Manji e Chen, 2002). A PKC é encontrada principalmente no cérebro, sendo essencial para os processos de neurotransmissão pré e pós-sináptica, regulando a excitabilidade neuronal, a liberação dos neurotransmissores e a plasticidade celular. Estudos pré-clínicos mostram que a administração do lítio leva a redução de PKC no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos sugerindo que a inibição da PKC tem também um importante papel nos efeitos terapêuticos desse estabilizador do humor (Zarate e Manji, 2009).

O lítio regula, ainda, moléculas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2, BDNF e β -catenina e promove uma diminuição da ativação de moléculas pró-apoptóticas, tais como proteína Bax, proteína tumoral p53 e caspases (Liechti et al., 2014). A lesão cerebral durante meningite pneumocócica pode ocorrer por necrose cortical e apoptose no giro denteado hipocampal, sendo esses danos encontrados em pacientes e em modelos experimentais (Grandgirard et al., 2007b). A apoptose neuronal ocorre por via dependente e independente de caspase e é causada por múltiplos fatores, incluindo componentes bacterianos e mediadores inflamatórios (Mook-Kanamori et al., 2011).

Esse conjunto de evidências pode ser relevante para o tratamento da meningite bacteriana, uma vez que as intervenções que influenciam processos inflamatórios e apoptóticos foram benéficas em modelos experimentais. Com base nas suas propriedades neuroprotetoras e neuroregenerativas é de suma importância o estudo do lítio como uma potencial estratégia terapêutica no contexto de meningite bacteriana.

1.7 TAMOXIFENO

A meningite pneumocócica é uma doença grave com altas taxas mortalidade e morbidade. As sequelas em longo prazo são frequentes e incluem déficit de memória e aprendizagem em aproximadamente 50% dos pacientes (Edmond et al., 2010; Baudon, 2011).

Durante a meningite pneumocócica, macrófagos residentes, astrócitos, células gliais e células endoteliais podem produzir citocinas, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórios em resposta à infecção (Grandgirard e Leib, 2010). Assim, a meningite bacteriana leva a um aumento da penetração cerebral de neutrófilos, ativação microglial pró-inflamatória, produção de ERO e subsequentemente disfunção mitocondrial, apoptose e necrose resultando em disfunção neuronal (Barichello et al., 2016).

Os neutrófilos fazem parte da primeira linha de defesa contra patógenos bacterianos. Para atingir os agentes patogênicos, os neutrófilos necessitam migrar do endotélio vascular até o local da infecção. As estratégias de defesa contra patógenos incluem fagocitose, produção e liberação de ERO e degranulação de moléculas antimicrobianas e inflamatórias. A PKC é uma proteína quinase serina/treonina que tem sido implicada na regulação de uma variedade de funções celulares, tais como proliferação, diferenciação e apoptose em resposta a uma gama diversificada de estímulos, sendo necessária para a montagem completa de NADPH oxidase e ativação da explosão respiratória (Bertram e Ley, 2011). A PKC desempenha um papel importante na regulação da plasticidade sináptica, da potencialização em longo prazo (LTP) e da depressão em longo prazo (LTD), podendo assim, regular o aprendizado e a memória (Liu et al., 2014).

Estudo de Ahn et al. sugeriram que uma resposta inflamatória à lesão no SNC mediada em parte pela microglia, pode ser crucial para induzir a morte celular necrótica e apoptótica (Ahn et al., 2006). Esta intensa resposta inflamatória contribui para danos cognitivos e pode ser fatal para os pacientes acometidos por meningite bacteriana (Grandgirard e Leib, 2010; Van De Beek et al., 2010). Evidências em humanos e em modelos animais sugerem que a morte celular, por apoptose e necrose, no hipocampo contribui para o prejuízo de memória e aprendizado (Izquierdo e Medina, 1997; Sellner et al., 2010). O dano hipocampal pode ser causado pela toxicidade direta de compostos bacterianos e pela reação inflamatória do hospedeiro, mediada por radicais livres, aminoácidos excitatórios e caspases (Mook-Kanamori et al., 2011).

Os fatores neurotróficos são responsáveis pelo crescimento e sobrevivência dos neurônios em desenvolvimento e pela manutenção de neurônios maduros. O NGF regula a sobrevivência, o desenvolvimento e o trofismo de populações neuronais específicas no SNP e central (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Cirulli e Alleva, 2009). O BDNF tem um papel importante na sobrevivência, diferenciação e crescimento de neurônios periféricos e centrais durante o desenvolvimento e na idade adulta. O GDNF tem um papel importante *in vivo* na manutenção e sobrevivência dos neurônios adultos (Boger et al., 2006; Pascual et al., 2008). Essas neurotrofinas, especialmente o BDNF, desempenham um papel importante na sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica e na formação da memória, principalmente no hipocampo. O BDNF endógeno pode ser um instrutor ativo de plasticidade sináptica na formação de potencialização em longo prazo (LTP) (Sohrabji e Lewis, 2006). Recentemente, foi demonstrado que em ratos adultos os níveis de BDNF do hipocampo estavam positivamente correlacionados com a capacidade de aprendizagem (Francia et al., 2006).

Embora mais conhecido como um modulador seletivo de receptor de estrogênio no tecido mamário, o tamoxifeno é um fármaco com uma ampla gama de atividades (Mikelman et al., 2016), podendo atuar como agonista em alguns tecidos – o tecido mamário, por exemplo – e antagonista em outros – como os tecidos cardíaco, ósseo e endometrial (Riggins et al., 2007; Kunath et al., 2012).

O tamoxifeno é a terapia endócrina usual (antiestrogênico) para o câncer de mama com receptor hormonal positivo. Pesquisas experimentais demonstraram que o tamoxifeno desempenha papéis neuroprotetores na lesão medular (Tian et al., 2009), hemorragia intracerebral (Xie et al., 2011), isquemia cerebral (Osuka et al., 2001) e lesão cerebral hipóxico-isquêmica (Feng et al., 2004).

Estudos mostraram um efeito anti-inflamatório *in vivo* e *in vitro* do tamoxifeno, onde esse fármaco pôde induzir uma resposta anti-inflamatória em modelos experimentais de ativação microglial com camundongos e cultura de células microgliais. Esta resposta pareceu não ser mediada pelo receptor de estrogênio, mas possivelmente a alguma modulação induzida pelo tamoxifeno nas cascatas de sinalização pró-inflamatória (Suuronen et al., 2005; Tapia-Gonzalez et al., 2008). *In vivo*, o tratamento com raloxifeno ou tamoxifeno, reduziu a inflamação aguda induzida por carragenina em ratas fêmeas (Misiewicz et al., 1996; Esposito et al., 2005). Além disso, em um ensaio clínico, o tamoxifeno mostrou diminuir a proteína C-reativa (marcador inflamatório) em 26%,

(Cushman et al., 2001) e também diminuiu a inflamação renal e diminuiu a gravidade da doença autoimune lúpus (Wu et al., 2000).

O tamoxifeno apresenta outro mecanismo de ação importante, que é a inibição da atividade da PKC. Einat et al. (2007) demonstraram o seu potencial efeito antimaníaco, onde o fármaco reduziu significativamente a hiperatividade e o comportamento de risco induzido pela anfetamina (d-AMPH) (Einat et al., 2007). É interessante notar que o tamoxifeno é um conhecido inibidor de PKC disponível para humanos, o qual demonstrou eficácia clínica e pré-clínica como anti-maníaco (Zarate e Manji, 2009; Cechinel-Recco et al., 2012).

Inicialmente desenvolvido para o tratamento do câncer, vários estudos pré-clínicos têm apoiado o potencial do tamoxifeno no tratamento de episódios agudos de transtorno bipolar (Zarate et al., 2007; Yildiz et al., 2008; Armani et al., 2014). O uso prolongado de inibidor de PKC no tratamento de transtornos de humor é controverso já que a PKC desempenha um papel importante na plasticidade sináptica e, por conseguinte no aprendizado e a memória (Liu et al., 2014). Além disso, a sinalização de estrogênio tem um papel importante nas regiões cerebrais envolvidas na regulação emocional e cognitiva (Brinton et al., 2008; Wharton et al., 2012). Uma vez que os pacientes com transtorno bipolar necessitam de um tratamento farmacológico contínuo ao longo da vida, o possível bloqueio de PKC e os efeitos de inibição de estrogênio proporcionados pelo tamoxifeno podem levar a efeitos colaterais negativos (Zarate e Manji, 2009; Armani et al., 2014).

Na meningite pneumocócica experimental, os animais apresentaram comprometimento da aprendizagem e da memória (Barichello et al., 2010c; Barichello et al., 2013a), e houve associação entre redução da expressão de BDNF no hipocampo e comprometimento da memória (Barichello et al., 2010a).

Vários estudos demonstraram que a sinalização de PKC e as neurotrofinas desempenham um papel fundamental na modulação entre si. Alguns autores descreveram os vários meios pelos quais a PKC pode levar a uma transcrição aumentada de RNA de fatores neurotróficos, tais como BDNF, NGF, GDNF e NT-3 em células do sistema nervoso (Lim e Alkon, 2012; Xu et al., 2013).

1.8 JUSTIFICATIVA

Atualmente, apesar dos avanços nos cuidados médicos, as taxas de mortalidade por meningite pneumocócica continuam altas e um número considerável de sobreviventes sofre com sequelas comportamentais,

perda de audição, convulsões, déficits neurológicos focais, prejuízo de aprendizagem e perda de memória. No entanto, os mecanismos biológicos que levam a esses danos nos pacientes após meningite bacteriana não são totalmente elucidados. Por isso, estudos combinando parâmetros comportamentais e neuroquímicos com tratamentos adjuvantes, que visam à melhora na compreensão dos mecanismos que levam à extensa degeneração neuronal são, sem dúvidas, de suma importância para a comunidade. Desta forma, os tratamentos com lítio e tamoxifeno podem, possivelmente, promover alterações estruturais e funcionais no SNC, aumentando a expressão de proteínas sinápticas, plasticidade sináptica e neurogênese, podendo assim diminuir os danos causados pela meningite, sendo um possível novo adjuvante terapêutico.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do lítio e tamoxifeno sobre os parâmetros comportamentais e as neurotrofinas BDNF, NGF e GDNF em animais submetidos à meningite pneumocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros de memória de habituação 10 dias após a indução de meningite pneumocócica através do teste de habituação ao campo aberto em ratos adultos tratados com lítio ou tamoxifeno.
- Avaliar os parâmetros de memória aversiva através do teste de esquiva inibitória em ratos adultos submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica 10 dias após indução e tratados com lítio ou tamoxifeno.
- Avaliar os níveis das neurotrofinas BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de ratos adultos submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica 10 dias após a indução e tratados com lítio ou tamoxifeno.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental e no Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC sobre o protocolo 045/2013 e 074/2015-1 (em anexo).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram utilizados para o estudo 120 ratos Wistar machos adultos, com peso corporal de 250 a 300 g provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), onde permaneceram alojados em local fresco e arejado em um ciclo de 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de 23 °C +/- 1 °C, com alimento e água sempre disponíveis.

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram qualquer má-formação aparente; peso inferior ou superior aos mencionados anteriormente, animais que já tinham sido usados em experimentos anteriores; animais que eventualmente morreram durante o experimento, antecedendo o tempo de eutanásia dos animais.

3.3 ORGANISMO INFECTANTE

S. pneumoniae, sorotipo III, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo Todd Hewitt, diluída em meio fresco e crescidas até a fase logarítmica. A cultura foi centrifugada durante 10 min a 5000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de 5×10^9 UFCol/mL (Grandgirard et al., 2007b).

3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizados sob anestesia, composta de uma administração via intraperitoneal (i.p) de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Hoogman et al., 2007; Barichello et al., 2010b).

Os animais foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha número 23 e receberam 10 μ L de LCR artificial como um placebo ou volume equivalente de suspensão bacteriana de *S. pneumoniae*. No momento da inoculação, os animais receberam reposição volêmica e foram devolvidos às suas gaiolas (Irazuzta et al., 2008; Barichello et al., 2010b). Dezoito horas após a indução, a meningite foi confirmada por uma cultura quantitativa de 5 μ L de LCR obtido por punção da cisterna magna e iniciado o tratamento com o antimicrobiano Ceftriaxona/Rocefin® (La Roche, Brasil) 100 mg/kg (i.p) de 12 em 12 h durante sete dias (Barichello et al., 2014).

3.5 TRATAMENTO E MODELO EXPERIMENTAL

O lítio (47,5 mg/Kg) (Sigma, St Louis, MO, USA) e tamoxifeno (1 mg/kg) (Salutas Pharma GmbH, Barleben, Germany), foram dissolvidos em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e administrado duas vezes ao dia durante 7 dias (i.p), com início no terceiro dia até o décimo dia após a indução da meningite (Cechinel-Recco et al., 2012).

Dez dias após a indução da meningite e trinta minutos após receberem a última dose dos tratamentos os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e esquiva inibitória. Os animais foram divididos nos grupos: controle/salina; controle/lítio; controle/tamoxifeno, meningite/salina, meningite/lítio e meningite/tamoxifeno com um n de 10 animais por grupo para a realização dos testes comportamentais de habituação ao campo (totalizando 60 animais), após o teste comportamental os animais foram mortos e a estrutura hipocampo retirada para a análise dos níveis de BDNF, NGF e GDNF. Novos animais foram utilizados para a realização do teste de esquiva inibitória (n de 10 animais por grupo, os mesmos descritos acima, totalizando 60 animais), como mostra a figura 2.

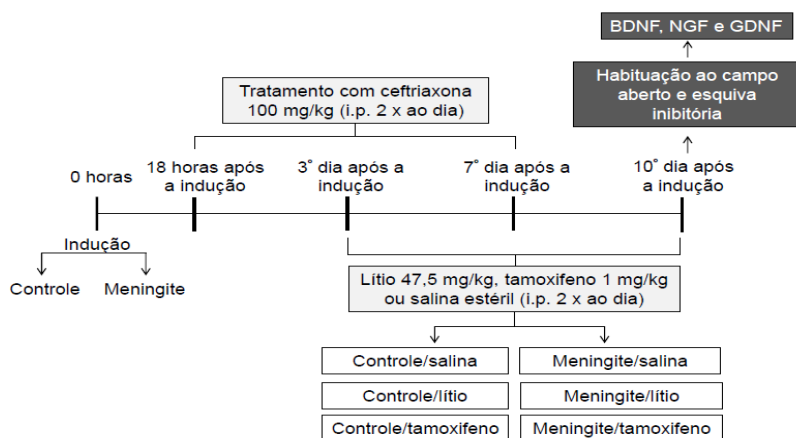


Figura 2: Representação da linha do tempo para a indução da meningite bacteriana, tratamento com ceftriaxona, lítio e tamoxifeno, testes comportamentais e morte dos animais.

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Habituação ao campo aberto

O comportamento foi realizado no aparato de campo aberto, a fim de avaliar as duas atividades locomotoras e exploratórias. O aparato mede 40×60 centímetros de campo aberto cercado por 50 centímetros de parede feitas de madeira com um vidro frontal (Figura 3). O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por cinco minutos (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados de volta para a sua gaiola moradia e 24 horas após eles foram submetidos a uma nova sessão no aparato de campo aberto (sessão de teste). Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal atravessava as linhas pretas demarcadas. A diminuição do número de cruzamentos (*crossings*) foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

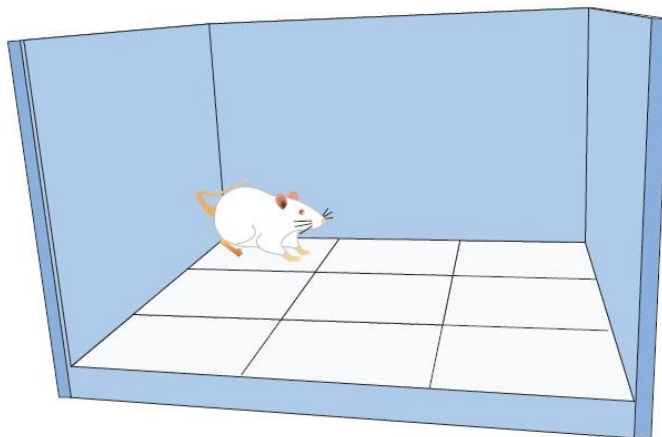


Figura 3: Teste de habituação ao campo aberto. Figura elaborada pelo autor.

3.6.2 Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento será colocada junto à parede esquerda do aparelho (figura 4). Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi medido com um dispositivo automático. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste de curta duração foi realizada 1,5 h após o treino (memória de curta duração). A sessão teste de longa duração foi realizada 24 h após a sessão treino (memória de longo prazo). Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi aplicado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Izquierdo et al., 1998; Bevilacqua et al., 2003). O teste de esquiva inibitória avalia a memória aversiva do animal. O aparato e os procedimentos têm sido descritos em estudos anteriormente publicados (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003).

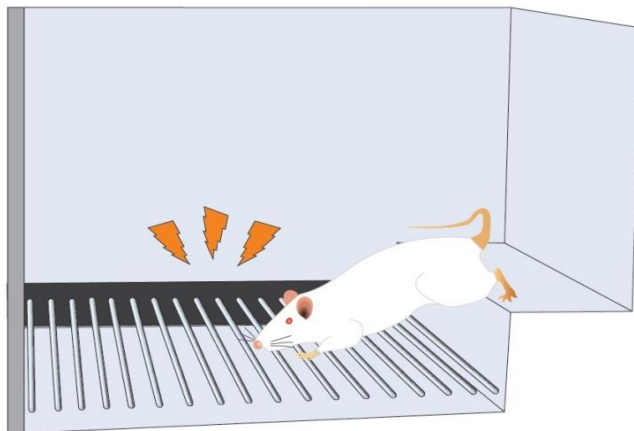


Figura 4: Teste de esquila inibitória. Figura elaborada pelo autor.

3.7 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE BDNF, NGF E GDNF

Após os testes comportamentais, os animais foram mortos e os seus hipocampus foram removidos para avaliar os níveis de BDNF, NGF e GDNF. Os níveis das neurotrofinas foram medidos por ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (NGF e BDNF de Chemicon, EUA e GDNF de Biosensis, EUA). Resumidamente, fatias de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato (PBS) com 1 mM de flúor fenilmetilsulfonil (PMSF) e etileno glicol 1mM bis (2-aminoetil éter)-N, N, N'N' ácido tetra acético (EGTA). Placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas por 24 h com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra. Então, as placas foram lavadas quatro vezes com diluentes amostras. Anticorpo monoclonal de rato anti-BDNF, anticorpo monoclonal de rato anti-NGF e anticorpo policlonal de rato GDNF, foram diluído 1:1000 em diluente de amostra e foram incubadas por 3 h em temperatura ambiente. Após a lavagem, uma segunda incubação com anti-rato conjugado 1:1000 do anticorpo peroxidase diluída para 1 h em temperatura ambiente foi realizado. Após a adição de estreptavidina-enzima-substrato, e a quantidade de BDNF, NGF e GDNF foram determinadas para absorbância de 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e a concentração de BDNF, NGF e GDNF. A proteína total foi medida pelo método de Lowry (1951) usando soro albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

3.8 ESTATÍSTICA

Para a avaliação dos níveis de neurotrofinas, os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido de teste *post hoc* Tukey.

Dados da tarefa de habituação ao campo aberto foram relatados como média \pm desvio padrão (DP) e foram analisados por ANOVA e testes post hoc de Tukey. Os dados para a tarefa de esquiva inibitória são relatados como mediana e intervalos interquartis, e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando testes U Man-Whitney. Os grupos interindividuais foram analisados pelos testes de Wilcoxon.

Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

4 RESULTADOS

As figuras 5 e 6 ilustram os efeitos do lítio ou tamoxifeno na memória de ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica. Os animais do grupo meningite submetidos à tarefa de habituação a campo aberto não apresentaram diferença entre as sessões treino e teste, demonstrando comprometimento da memória ($p < 0,05$). Por outro lado, nos grupos controle/salina, controle/lítio, controle/tamoxifeno e meningite/lítio, houve diferença no número de cruzamentos entre as sessões, demonstrando memória de habituação ($p < 0,05$, figura 5).

Na tarefa de esQUIVA inibitória, houve diferença entre as sessões treino e teste nos grupos controle/salina, controle/lítio, controle/tamoxifeno e meningite/lítio, demonstrando memória aversiva de curto e longo prazo nestes grupos ($p < 0,05$). Nos grupos meningite/salina e meningite/tamoxifeno, no entanto, não houve diferença entre as sessões de treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva de curto e longo prazo nestes animais ($p > 0,05$, figura 6).

A figura 7 ilustra os efeitos do lítio ou tamoxifeno sobre os níveis de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica. Os níveis de BDNF diminuíram no hipocampo dos grupos meningite/salina e meningite/tamoxifeno quando comparados com o grupo controle/salina ($p < 0,05$). No entanto, o lítio como tratamento adjuvante restabeleceu os níveis de BDNF no grupo meningite/lítio (figura 7A). Os níveis de NGF diminuíram apenas no grupo meningite/tamoxifeno ($p < 0,05$, figura 7B). Os níveis de GDNF diminuíram no hipocampo dos grupos meningite/salina e meningite/tamoxifeno quando comparados com o grupo controle/salina ($p < 0,05$). O lítio como tratamento adjuvante, no entanto, restabeleceu os níveis de GDNF no grupo meningite/lítio (figura 7C).

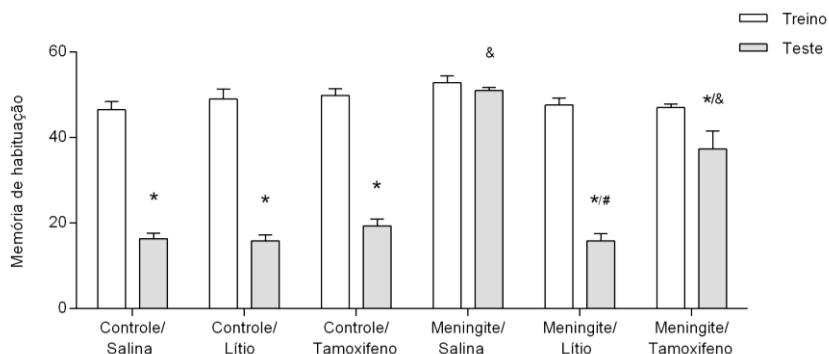


Figura 5: Efeitos do lítio e do tamoxifeno no teste de habituação ao campo aberto em ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os números de cruzamentos e levantamentos são relatados como a média \pm DP e foram analisados por ANOVA e testes post hoc de Tukey (10 animais por grupo). * $p < 0,05$ estatisticamente diferentes da sessão treino; & $p < 0,05$ estatisticamente diferentes do grupo controle/salina e # $p < 0,05$ estatisticamente diferentes do grupo meningite/salina.

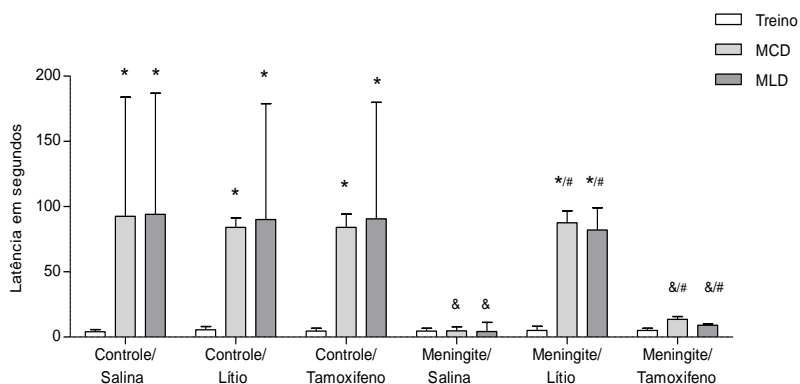
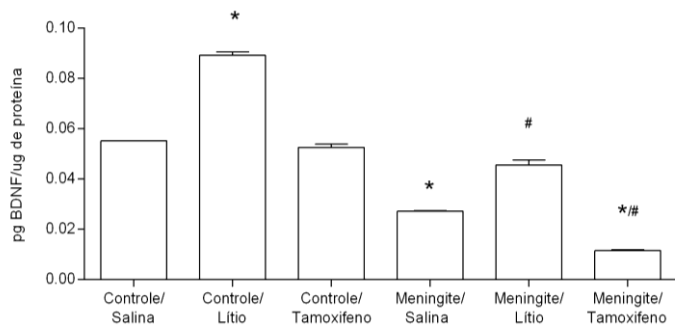
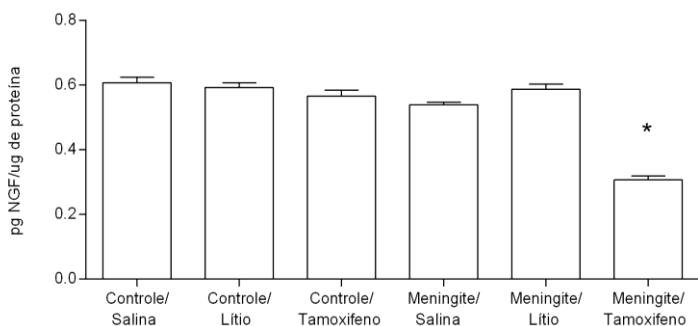


Figura 6: Efeitos do lítio e do tamoxifeno no teste comportamental de esquia inibitória em ratos Wistar adultos 10 dias após indução de meningite pneumocócica. Os dados são relatados como mediana e intervalos interquartis, e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando testes U Mann-Whitney. Os grupos interindividuais foram analisados pelos testes de Wilcoxon. * $p < 0,05$ indicam diferenças entre sessões de treino e de teste, conforme determinado por Wilcoxon; & $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina como descrito por Man-Whitney e # $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo meningite/salina como determinado por Man-Whitney.

A



B



C

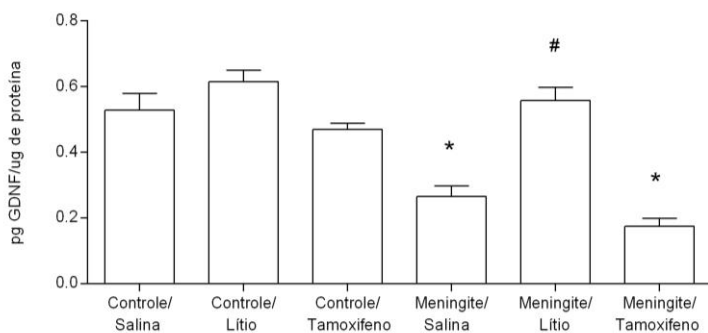


Figura 7: Efeitos do lítio e do tamoxifeno na expressão de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo de ratos Wistar 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os níveis de BDNF (A), NGF (B) e GDNF (C) foram avaliados por ELISA e os resultados foram apresentados em pg por 100 mg de tecido. Todos os dados são relatados como média \pm SEM. Os resultados foram

analisados por ANOVA de duas vias, seguido por um teste *post-hoc* de Tukey. Os símbolos * $p < 0,05$ indicam significância estatística em comparação com o grupo controle/salina; # $p < 0,05$ indicam significância estatística quando comparados com o grupo meningite/salina.

5 DISCUSSÃO

A meningite é uma infecção frequente e grave do SNC que afeta a pia-máter, a aracnóide e o espaço subaracnóideo (Van De Beek et al., 2004). O uso de vacinas conjugadas modificou a epidemiologia da meningite (Shin e Kim, 2012). No entanto, a meningite pneumocócica continua uma causa importante de mortalidade e morbidade em todo o mundo e o incompleto conhecimento da sua patogênese, associado à emergência de bactérias resistentes aos antimicrobianos e a ausência de novos alvos para terapia adjuvante, contribui para esta mortalidade e morbidade (Mook-Kanamori et al., 2011). O risco de pacientes sobreviventes desenvolverem pelo menos uma seqüela como déficits cognitivos, perda auditiva bilateral, déficits motores, convulsões, deficiência visual e hidrocefalia, é de aproximadamente 16,2 a 35,5 % (Edmond et al., 2010). Os modelos animais experimentais demonstraram que o resultado da meningite bacteriana está relacionado com a gravidade da inflamação e que este resultado pode ser melhorado modulando a inflamação (Mook-Kanamori et al., 2011). No entanto, novas terapias adjuvantes são necessárias para melhorar o prognóstico da meningite bacteriana.

No presente estudo investigamos os efeitos do tratamento adjuvante com lítio e tamoxifeno sobre as alterações comportamentais e a níveis de BDNF, NGF e GDNF na meningite bacteriana.

Verificou-se aqui que animais submetidos à meningite por *S. pneumoniae* apresentaram dano de memória de habituação e de memória aversiva e diminuição dos níveis de BDNF e GDNF no hipocampo 10 dias após inoculação bacteriana, demonstrando assim uma possível correlação entre dano cognitivo e baixos níveis de neurotrofinas. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Barichello et al, em 2010, onde demonstraram que os animais sobreviventes à meningite pneumocócica tiveram prejuízo de memória e aprendizagem (Barichello et al., 2010c), bem como a diminuição dos níveis de neurotrofinas (Barichello et al., 2010a; Barichello et al., 2014).

Em um estudo anterior de Barichello et al, observou-se que animais submetidos à meningite apresentaram prejuízo de memória aversiva de curto e longo prazo, prejuízo na memória de habituação e diminuição dos níveis de BDNF e GDNF no hipocampo 10 dias após a indução, danos estes que foram prevenidos nos animais que receberam tratamento adjuvante com butirato de sódio (Barichello et al., 2014).

O lítio é uma antiga droga que vem sendo estudada como um agente neuroprotetor em uma variedade de doenças neurológicas, degenerativas e infecções cerebrais (Kaplanski et al., 2014; Leeds et al., 2014b; Liechti

et al., 2014) e tem sido utilizado no tratamento da depressão maníaca há mais de 100 anos (Leeds et al., 2014b).

No presente estudo o tratamento adjuvante com lítio foi capaz de prevenir dano de memória de habituação e memória aversiva de curto e longo prazo. Entretanto, os animais que receberam tratamento com tamoxifeno apresentaram comprometimento de ambas as memórias. Em 2014, Liechti et al, demonstram que ratos sobreviventes à meningite pneumocócica e que foram tratados com lítio apresentaram um desempenho de aprendizagem significativamente melhor durante o teste de labirinto aquático de Morris em comparação ao grupo meningite que recebeu solução salina (Liechti et al., 2014). O tratamento com lítio também melhorou a aprendizagem espacial e a capacidade de memória no labirinto aquático de Morris em ratos após isquemia cerebral global transitória (Bian et al., 2007). Fan et al (2015) demonstraram em um modelo de isquemia-reperfusão que a administração de pré-lítio (prevenção) e lítio (tratamento) melhorou significativamente os déficits cognitivos, diminuindo a latência e aumentando a porcentagem de tempo que os ratos passaram no quadrante alvo no teste de labirinto aquático de Morris, confirmando prevenção da memória. Este teste é amplamente utilizado como uma medida para o prejuízo cognitivo relacionado com o hipocampo (Fan et al., 2015).

Concordando com os presentes achados, um estudo anterior demonstrou que administrações repetidas de tamoxifeno em camundongos machos induziram déficits na aquisição ou retenção de respostas em um procedimento de aprendizagem chamado auto-moldagem, teste experimental usado para estudar o condicionamento clássico (Walker et al., 2011). Curiosamente, um estudo clínico mostrou que o tratamento prolongado com tamoxifeno em mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama prejudicou domínios cognitivos que dependem de habilidades verbais (memória verbal e fluência) (Boele et al., 2015). De fato, há um conjunto de evidências mostrando que os pacientes que recebem tratamento com tamoxifeno têm deficiências de memória verbal (Schilder et al., 2009), função executiva (Schilder et al., 2010), habilidade visual espacial e velocidade de processamento (Palmer et al., 2008), quando comparados aos controles saudáveis.

O tamoxifeno é um antagonista competitivo de receptor de estrogênio. Evidências indicam que o estrogênio tem a capacidade de regular várias funções neuronais, incluindo o aprendizado e a memória (McEwen et al., 2012). Esta capacidade é atribuída às funções do receptor de estrogênio α (ER α) associado à membrana e do receptor de estrogênio β (ER β), bem como o receptor sensível ao estrogênio acoplado à proteína G

(GPER1) (Liu et al., 2008; Walf et al., 2008). Hammond et al (2009) demonstraram que GPER1, através da ativação do agonista do estrogênio, tem um efeito benéfico na função cognitiva e que os antagonistas dos receptores de estrogênio têm efeitos deletérios nas funções cognitivas (Hammond et al., 2009). De fato, foram demonstradas deficiências nas tarefas de trabalho e memória espacial em ratas ovariectomizadas. O tratamento agudo com estrogênios reverteu os déficits cognitivos induzidos pela ovariectomia (Gibbs e Johnson, 2008). Por conseguinte, os autores sugerem que o tamoxifeno prejudica a memória através da inibição do receptor estrogênico.

É importante notar que, no presente estudo, o tamoxifeno diminuiu os níveis de BDNF, NGF e GDNF no hipocampo quando comparado com os grupos meningite e meningite tratados com lítio. Conforme descrito anteriormente, a PKC desempenha um papel crucial na regulação da plasticidade sináptica e de várias formas de aprendizagem e memória (Chu et al., 2014; Sun e Alkon, 2014) e que a sinalização de PKC e de neurotrofinas podem desempenhar um papel fundamental na modulação entre si. Esta sinalização de fator neurotrófico tem um papel importante nas funções de neuroproteção e reparação de neurônios colinérgicos em regiões específicas do cérebro relacionadas com a formação de memória (Williams et al., 2006).

Alguns autores descreveram os vários meios pelos quais a PKC pode levar a uma transcrição aumentada de RNA de fatores neurotróficos, tais como BDNF, NGF, GDNF e NT-3 em células do sistema nervoso (Lim e Alkon, 2012).

As neurotrofinas, BDNF, NGF e GDNF, possuem diversas funções no SNC como, neurogênese, diferenciação e sobrevivência neuronal e estão envolvidas em vias moleculares que são relevantes para a cognição, aprendizagem e processos de memória (Allen et al., 2013; Martinez-Levy e Cruz-Fuentes, 2014). Em estudo de Li et al (2007) verificou-se que o BDNF e seu receptor TrkB diminuíram concomitantemente no cérebro durante meningite experimental por *S. pneumoniae* (Li et al., 2007). Resultado este que está de acordo com o encontrado nesse estudo. Além disso, a administração de BDNF exógeno aumentou a população neuronal tanto no córtex cerebral como no hipocampo de ratos submetidos à meningite pneumocócica através da síntese de BDNF e da ativação do receptor TrkB contribuindo para a melhoria da neurogênese após a meningite (Li et al., 2007). A manutenção da expressão do BDNF no cérebro durante a meningite pneumocócica pode, por conseguinte, ser um mecanismo que impeça o comprometimento cognitivo (Barichello et al., 2014).

O GDNF também foi relatado como uma neurotrofina neuroprotetora na isquemia cerebral (Duarte et al., 2012), uma vez que o tratamento com ele foi eficaz na redução de danos cerebrais e na prevenção da aprendizagem e do comprometimento da memória em um modelo de isquemia experimental em ratos neonatos (Katsuragi et al., 2011). Portanto, pode-se sugerir que o comprometimento da memória induzido por tamoxifeno também pode estar associado a níveis diminuídos de neurotrofinas no hipocampo de ratos.

Por outro lado, o lítio restabeleceu os níveis de BDNF e GDNF no hipocampo dos animais submetidos à meningite pneumocócica. Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de que o lítio tem uma ação direta na expressão do BDNF, aumentando seus níveis e protegendo o cérebro contra danos cognitivos. Há também um conjunto de dados que mostram que o lítio aumenta os níveis de neurotrofinas (Manji et al., 2000; Frey et al., 2006a; Jornada et al., 2010; Cechinel-Recco et al., 2012; Varela et al., 2015). Apesar de inibir a PKC, está bem descrito que lítio ativou seletivamente o receptor do promotor IV do BDNF de neurônios primários e aumentou os níveis de BDNF em hipocampo de ratos (Frey et al., 2006b; Yasuda et al., 2009).

Em estudo experimental de isquemia-reperfusão o tratamento com lítio diminuiu a apoptose e aumentou a expressão de BDNF e pCREB no hipocampo dos animais, desempenhando um papel neuroprotetor (Yan et al., 2007). Vários estudos demonstraram que os efeitos de lítio podem ser, em parte, através da modulação de fatores neurotróficos (Rybakowski, 2014). Em outro estudo, com modelo experimental de isquemia-reperfusão investigou-se os efeitos do lítio sobre a expressão da proteína BDNF, CREB e pCREB e o tratamento aumentou significativamente a expressão de BDNF em comparação com o grupo controle (Fan et al., 2015). Em 2012, Cechinel-Recco et al demonstraram que a d-AMPH diminuiu os níveis de NGF e BDNF no cérebro de ratos e o tratamento com lítio e tamoxifeno aumentaram os níveis destas neurotrofinas, protegendo assim, o cérebro contra esta deficiência induzida por d-AMPH (Cechinel-Recco et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

Apesar dos importantes avanços no tratamento, a meningite pneumocócica é uma das mais importantes doenças infecciosas do SNC, com altas taxas de mortalidade e morbidade. São necessárias novas estratégias experimentais para reduzir o comprometimento cognitivo em sobreviventes após meningite.

Esses resultados demonstraram os efeitos do lítio e tamoxifeno na meningite pneumocócica, onde o lítio apresentou um efeito neuroprotetor com o aumento dos níveis de neurotrofinas e prevenção de dano cognitivo. Entretanto, o tamoxifeno piorou o prognóstico dos animais que receberam o tratamento. Por conseguinte, pode sugerir-se que os tratamentos em longo prazo com tamoxifeno podem levar a uma deterioração cognitiva significativa reduzindo os níveis de fatores neurotróficos no cérebro de ratos.

Uma compreensão mais detalhada da meningite bacteriana ocasionada pelo *S. pneumoniae*, da indução da resposta inflamatória do hospedeiro e de seus efeitos é sem dúvida desejável e indispensável. Entretanto deve-se reconhecer que grande parte da cascata de eventos está sendo elucidada. Portanto, esforços para compreender e apoiar a capacidade reparadora do hospedeiro, uma área que até agora tem recebido pouca atenção, pode ser tão importante quanto desvendar os mecanismos que levam a danos.

REFERÊNCIAS

- Abraham AL, Focaccia R, Gattaz WF. Childhood meningitis increases the risk for adult schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2005;6 Suppl 2:44-8.
- Ahn YH, Lee G, Kang SK. Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis, and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348(2):560-70.
- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(5):383-94.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*. 2013;138(2):155-75.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78.
- Armani F, Andersen ML, Galduroz JC. Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. *Psychopharmacology*. 2014;231(4):639-49.
- Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K, Impey S. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci*. 2004;24(18):4324-32.
- Barichello T, Belarmino E, Jr., Comim CM, Cipriano AL, Generoso JS, Savi GD, Stertz L, Kapczinski F, Quevedo J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic [correction of neurotrophic] factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol*. 2010a;223(1-2):73-6.
- Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol*. 2010b;221(1-2):42-5.
- Barichello T, Generoso JS, Collodel A, Moreira AP, Almeida SM. Pathophysiology of acute meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and adjunctive therapy approaches. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012;70(5):366-72.
- Barichello T, Generoso JS, Milioli G, Elias SG, Teixeira AL. Pathophysiology of bacterial infection of the central nervous system and its putative role in the pathogenesis of behavioral changes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013a;35(1):81-7.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Elias SG, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Oxid Med Cell Longev*. 2013b;371465(10):9.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Faller CJ, Ceretta RA, Petronilho F, Lopes-Borges J, Valvassori SS, Quevedo J. Sodium Butyrate Prevents Memory Impairment by Re-establishing BDNF and GDNF Expression in Experimental Pneumococcal Meningitis. *Mol Neurobiol*. 2014;5:5.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Goularte JA, Petronilho F, Saigal P, Badawy M, Quevedo J. Role of Microglial Activation in the Pathophysiology of Bacterial Meningitis. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1770-81.

Barichello T, Silva GZ, Generoso JS, Savi GD, Michelon CM, Feier G, Comim CM, Quevedo J. Time-dependent behavioral recovery after pneumococcal meningitis in rats. *J Neural Transm*. 2010c;117(7):819-26.

Baudon JJ. [Pneumococcal meningitis, long term consequences]. *Soins Pédiatr Pueric*. 2011(262):11.

Bertram A, Ley K. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch Immunol Ther Exp*. 2011;59(2):79-87.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci*. 2003;17(4):897-902.

Bian Q, Shi T, Chuang DM, Qian Y. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res*. 2007;12:270-6.

Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-31.

Boele FW, Schilder CM, de Roode ML, Deijen JB, Schagen SB. Cognitive functioning during long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women with breast cancer. *Menopause*. 2015;22(1):17-25.

Boger HA, Middaugh LD, Huang P, Zaman V, Smith AC, Hoffer BJ, Tomac AC, Granholm AC. A partial GDNF depletion leads to earlier age-related deterioration of motor function and tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra. *Exp Neurol*. 2006;202(2):336-47.

Bohland M, Kress E, Stope MB, Pufe T, Tauber SC, Brandenburg LO. Lack of Toll-like receptor 2 results in higher mortality of bacterial meningitis by impaired host resistance. *J Neuroimmunol*. 2016;299:90-7.

- Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull.* 2010;57(1):B4119.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):313-39.
- Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):467-92.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):297-305.
- Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2015;6(5):331-41.
- Caldero J, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, Esquerda JE. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience.* 2010;165(4):1353-69.
- Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Arent CO, Vitto MF, Luz G, de Souza CT, Quevedo J. Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol.* 2012;26(12):1594-604.
- Chu Y, Fioravante D, Leitges M, Regehr WG. Calcium-dependent PKC isoforms have specialized roles in short-term synaptic plasticity. *Neuron.* 2014;82(4):859-71.
- Cirulli F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30(3):379-95.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.
- Cottagnoud PH, Tauber MG. New therapies for pneumococcal meningitis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004;13(4):393-401.
- Cushman M, Costantino JP, Tracy RP, Song K, Buckley L, Roberts JD, Krag DN. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: Suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(2):255-61.
- Diniz BS, Teixeira AL. Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med.* 2011;13(4):217-22.

- Dorsett M, Liang SY. Diagnosis and Treatment of Central Nervous System Infections in the Emergency Department. *Emerg Med Clin North Am.* 2016;34(4):917-42.
- Drijkoningen JJ, Rohde GG. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clin Microbiol Infect.* 2014;5:45-51.
- Duarte EP, Curcio M, Canzoniero LM, Duarte CB. Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. *Growth Factors.* 2012;30(4):242-57.
- Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(5):317-28.
- Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji HK. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology.* 2007;55(3-4):123-31.
- Esposito E, Iacono A, Raso GM, Pacilio M, Coppola A, Di Carlo R, Meli R. Raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces carrageenan-induced acute inflammation in normal and ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2005;146(8):3301-8.
- Fan M, Jin W, Zhao H, Xiao Y, Jia Y, Yin Y, Jiang X, Xu J, Meng N, Lv P. Lithium chloride administration prevents spatial learning and memory impairment in repeated cerebral ischemia-reperfusion mice by depressing apoptosis and increasing BDNF expression in hippocampus. *Behav Brain Res.* 2015;291:399-406.
- Feng Y, Fratkins JD, LeBlanc MH. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;484(1):65-74.
- Forlenza OV, De-Paula VJ, Diniz BS. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(6):443-50.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature.* 1996;383(6596):166-8.
- Francia N, Cirulli F, Chiarotti F, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins. *Eur J Neurosci.* 2006;23(3):711-28.
- Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on

- hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006a;79(3):281-6.
- Frey BN, Andreazza AC, Rosa AR, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Hatch JP, Quevedo J, Kapczinski F. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. *Behav Pharmacol.* 2006b;17(4):311-8.
- Gerber J, Nau R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol.* 2010;23(3):312-8.
- Gianinazzi C, Grandgirard D, Simon F, Imboden H, Joss P, Tauber MG, Leib SL. Apoptosis of hippocampal neurons in organotypic slice culture models: direct effect of bacteria revisited. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(6):610-7.
- Gibbs RB, Johnson DA. Sex-specific effects of gonadectomy and hormone treatment on acquisition of a 12-arm radial maze task by Sprague Dawley rats. *Endocrinology.* 2008;149(6):3176-83.
- Grandgirard D, Biffrare YD, Pleasure SJ, Kummer J, Leib SL, Tauber MG. Pneumococcal meningitis induces apoptosis in recently postmitotic immature neurons in the dentate gyrus of neonatal rats. *Dev Neurosci.* 2007a;29(1-2):134-42.
- Grandgirard D, Leib SL. Strategies to prevent neuronal damage in paediatric bacterial meningitis. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18(2):112-8.
- Grandgirard D, Leib SL. Meningitis in neonates: bench to bedside. *Clin Perinatol.* 2010;37(3):655-76.
- Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007b;114(6):609-17.
- Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001;65(4):391-426.
- Hammond R, Mauk R, Ninaci D, Nelson D, Gibbs RB. Chronic treatment with estrogen receptor agonists restores acquisition of a spatial learning task in young ovariectomized rats. *Horm Behav.* 2009;56(3):309-14.
- Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(9):367-87.
- Harada T, Harada C, Parada LF. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev.* 2007;21(4):367-78.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature.* 2000;406(6791):86-90.

- Honda H, Warren DK. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(3):609-23.
- Hoogman M, van de Beek D, Weisfelt M, de Gans J, Schmand B. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78(10):1092-6.
- Hu X, Liou AK, Leak RK, Xu M, An C, Suenaga J, Shi Y, Gao Y, Zheng P, Chen J. Neurobiology of microglial action in CNS injuries: Receptor-mediated signaling mechanisms and functional roles: *Prog Neurobiol.* 2014 Jun 9. pii: S0301-0082(14)00069-0. doi: 10.1016/j.pneurobio.2014.06.002.
- Huang TL, Lee CT, Liu YL. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res.* 2008;42(7):521-5.
- Irazuzta J, Pretzlaff RK, DeCourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 2005;31(1):146-50.
- Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B. Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis. *Crit Care Med.* 2008;36(5):1603-6.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998;393(6686):635-6.
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997;68(3):285-316.
- Jauneikaite E, Jefferies JM, Hibberd ML, Clarke SC. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive and non-invasive disease in South East Asia: a review. *Vaccine.* 2012;30(24):3503-14.
- Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res.* 2010;44(8):506-10.
- Kaplanski J, Nassar A, Sharon-Granit Y, Jabareen A, Kobal SL, Azab AN. Lithium attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(12):1829-37.
- Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain.* 2003;126(Pt 5):1015-25.
- Katsuragi S, Ikeda T, Ikenoue T. [A strategy to treat neonatal hypoxic encephalopathy using glial cell line-derived neurotrophic factor]. *No To Hattatsu.* 2011;43(4):265-72.

- Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(1):32-42.
- Kimura A, Namekata K, Guo X, Harada C, Harada T. Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
- Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol.* 1999;9(1):57-67.
- Kramer ER, Liss B. GDNF-Ret signaling in midbrain dopaminergic neurons and its implication for Parkinson disease. *FEBS Lett.* 2015;589(24 Pt A):3760-72.
- Kritas SK, Saggini A, Cerulli G, Caraffa A, Antinolfi P, Pantalone A, Frydas S, Rosati M, Tei M, Speziali A, Saggini R, Pandolfi F, Conti P. Neuropeptide NGF mediates neuro-immune response and inflammation through mast cell activation: *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014 Apr-Jun;28(2):177-81.; 2014.
- Kunath F, Keck B, Antes G, Wullich B, Meerpohl JJ. Tamoxifen for the management of breast events induced by non-steroidal antiandrogens in patients with prostate cancer: a systematic review. *BMC Med.* 2012;10(96):1741-7015.
- Leeds PR, Yu F, Wang Z, Chiu C-T, Zhang Y, Leng Y, Linares GR, Chuang D-M. A New Avenue for Lithium: Intervention in Traumatic Brain Injury. *ACS Chemical Neuroscience.* 2014a;5(6):422-33.
- Leeds PR, Yu F, Wang Z, Chiu CT, Zhang Y, Leng Y, Linares GR, Chuang DM. A new avenue for lithium: intervention in traumatic brain injury. *ACS Chem Neurosci.* 2014b;5(6):422-33.
- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Tauber MG. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest.* 1996;98(11):2632-9.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968;48(3):534-69.
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.* 1996;19(11):514-20.
- Levin ED, Slade S, Wells C, Cauley M, Petro A, Vendittelli A, Johnson M, Williams P, Horton K, Rezvani AH. Threshold of adulthood for the onset of nicotine self-administration in male and female rats. *Behav Brain Res.* 2011;225(2):473-81.
- Li L, Shui QX, Liang K, Ren H. Brain-derived neurotrophic factor rescues neurons from bacterial meningitis. *Pediatr Neurol.* 2007;36(5):324-9.

Lian D, He D, Wu J, Liu Y, Zhu M, Sun J, Chen F, Li L. Exogenous BDNF increases neurogenesis in the hippocampus in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neuroimmunol.* 2016;294:46-55.

Liechti FD, Grandgirard D, Leib SL. Bacterial meningitis: insights into pathogenesis and evaluation of new treatment options: a perspective from experimental studies. *Future Microbiol.* 2015;10(7):1195-213.

Liechti FD, Studle N, Theurillat R, Grandgirard D, Thormann W, Leib SL. The mood-stabilizer lithium prevents hippocampal apoptosis and improves spatial memory in experimental meningitis. *PLoS One.* 2014;9(11).

Lim CS, Alkon DL. Protein kinase C stimulates HuD-mediated mRNA stability and protein expression of neurotrophic factors and enhances dendritic maturation of hippocampal neurons in culture. *Hippocampus.* 2012;22(12):2303-19.

Liu B, Feng J, Wang JH. Protein kinase C is essential for kainate-induced anxiety-related behavior and glutamatergic synapse upregulation in prelimbic cortex. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(11):982-90.

Liu F, Day M, Muniz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 2008;11(3):334-43.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Macedo-Ramos H, Ruiz-Mendoza S, Mariante RM, Guimaraes EV, Quadros-de-Souza LC, Paiva MM, Ferreira EO, Pinto TC, Teixeira LM, Allodi S, Baetas-da-Cruz W. *Streptococcus pneumoniae* resists intracellular killing by olfactory ensheathing cells but not by microglia. *Sci Rep.* 2016;6(36813).

Malhi GS, Tanious M, Das P, Berk M. The science and practice of lithium therapy. *Aust N Z J Psychiatry.* 2012;46(3):192-211.

Manji HK, Chen G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):S46-56.

Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry.* 2000;5(6):578-93.

- Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.* 2005;6(8):777-84.
- Martinez-Levy GA, Cruz-Fuentes CS. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Biol Med.* 2014;87(2):173-86.
- Martner A, Dahlgren C, Paton JC, Wold AE. Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun.* 2008;76(9):4079-87.
- McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci.* 2012;126(1):4-16.
- McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet.* 2012;380(9854):1703-11.
- Mikelman S, Mardirossian N, Gnegy ME. Tamoxifen and amphetamine abuse: Are there therapeutic possibilities? *J Chem Neuroanat.* 2016;30(16):30071-0.
- Misiewicz B, Griebler C, Gomez M, Raybourne R, Zelazowska E, Gold PW, Sternberg EM. The estrogen antagonist tamoxifen inhibits carrageenan induced inflammation in LEW/N female rats. *Life Sci.* 1996;58(16):L281-6.
- Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):411-8.
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016;8(3):227-41.
- Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(3):557-91.
- Nassar A, Azab AN. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(6):451-8.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: principles of biochemistry* 5 th ed. New York W.H. Freeman and Company; 2011.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 2004;427(6977):843-8.
- Okike IO, Ribeiro S, Ramsay ME, Heath PT, Sharland M, Ladhani SN. Trends in bacterial, mycobacterial, and fungal meningitis in England

and Wales 2004-11: an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(4):301-7.

Ostergaard C, Brandt C, Konradsen HB, Samuelsson S. Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1212-20.

Osuka K, Feustel PJ, Mongin AA, Tranmer BI, Kimelberg HK. Tamoxifen inhibits nitrotyrosine formation after reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem.* 2001;76(6):1842-50.

Palmer JL, Trotter T, Joy AA, Carlson LE. Cognitive effects of Tamoxifen in pre-menopausal women with breast cancer compared to healthy controls. *J Cancer Surviv.* 2008;2(4):275-82.

Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JJ, Pintado CO, Gomez-Diaz R, Lopez-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci.* 2008;11(7):755-61.

Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol.* 1997;8(8):713-7.

Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1164-71.

Ricci A, Mariotta S, Pompili E, Mancini R, Bronzetti E, Vitis Cd, Pisani L, Cherubini E, Bruno P, Gencarelli G, Giovagnoli Mr, Terzano C, Ciliberto G, Giarnieri E, Fumagalli L. Neurotrophinsystem activation in pleural effusion. *Growth Factors.* 2010;28(4):221-31.

Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett.* 2007;256(1):1-24.

Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res.* 2003;975(1-2):207-13.

Rybakowski JK. Factors associated with lithium efficacy in bipolar disorder. *Harv Rev Psychiatry.* 2014;22(6):353-7.

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature.* 1996;382(6586):70-3.

Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol.* 2013;4(387):00387.

- Schilder CM, Eggens PC, Seynaeve C, Linn SC, Boogerd W, Gundy CM, Beex LV, Van Dam FS, Schagen SB. Neuropsychological functioning in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen or exemestane after AC-chemotherapy: cross-sectional findings from the neuropsychological TEAM-side study. *Acta Oncol.* 2009;48(1):76-85.
- Schilder CM, Seynaeve C, Beex LV, Boogerd W, Linn SC, Gundy CM, Huizenga HM, Nortier JW, van de Velde CJ, van Dam FS, Schagen SB. Effects of tamoxifen and exemestane on cognitive functioning of postmenopausal patients with breast cancer: results from the neuropsychological side study of the tamoxifen and exemestane adjuvant multinational trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(8):1294-300.
- Sellner J, Tauber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol.* 2010;96:1-16.
- Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry.* 2008;64(6):527-32.
- Shin SH, Kim KS. Treatment of bacterial meningitis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(15):2189-206.
- Sohrabji F, Lewis DK. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol.* 2006;27(4):404-14.
- Sun MK, Alkon DL. The "memory kinases": roles of PKC isoforms in signal processing and memory formation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;122:31-59.
- Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A, Salminen A. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. *Inflamm Res.* 2005;54(5):194-203.
- Takhar SS, Ting SA, Camargo CA, Jr., Pallin DJ. U.S. emergency department visits for meningitis, 1993-2008. *Acad Emerg Med.* 2012;19(6):632-9.
- Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J Endocrinol.* 2008;198(1):219-30.
- Tauber SC, Stadelmann C, Spreer A, Bruck W, Nau R, Gerber J. Increased expression of BDNF and proliferation of dentate granule cells after bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(9):806-15.
- Tian DS, Liu JL, Xie MJ, Zhan Y, Qu WS, Yu ZY, Tang ZP, Pan DJ, Wang W. Tamoxifen attenuates inflammatory-mediated damage and

- improves functional outcome after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*. 2009;109(6):1658-67.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An introduction*. 10 th ed: Pearson Education, Inc; 2014.
- Turnquist HR, Cardinal J, Macedo C, Rosborough BR, Sumpter TL, Geller DA, Metes D, Thomson AW. mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. *Blood*. 2010;115(23):4758-69.
- Valvassori SS, Tonin PT, Varela RB, Carvalho AF, Mariot E, Amboni RT, Bianchini G, Andersen ML, Quevedo J. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord*. 2015;17(5):507-17.
- van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1849-59.
- van de Beek D, Drake JM, Tunkel AR. Nosocomial bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 2010;362(2):146-54.
- van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56.
- Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Amboni RT, Bianchini G, Quevedo J. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res*. 2015;61:114-21.
- Varon E. [Epidemiology of acute bacterial meningitis in adult patients in France]. *Med Mal Infect*. 2009;39(7-8):432-44.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*. 2000;7(5):333-40.
- Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H. Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci*. 2005;99(4):307-21.
- Walf AA, Koonce CJ, Frye CA. Estradiol or diarylpropionitrile administration to wild type, but not estrogen receptor beta knockout, mice enhances performance in the object recognition and object placement tasks. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(4):513-21.
- Walker EA, Foley JJ, Clark-Vetri R, Raffa RB. Effects of repeated administration of chemotherapeutic agents tamoxifen, methotrexate, and

- 5-fluorouracil on the acquisition and retention of a learned response in mice. *Psychopharmacology*. 2011;217(4):539-48.
- Wharton W, Gleason CE, Olson SR, Carlsson CM, Asthana S. Neurobiological Underpinnings of the Estrogen - Mood Relationship. *Curr Psychiatry Rev*. 2012;8(3):247-56.
- Williams BJ, Bimonte-Nelson HA, Granholm-Bentley AC. ERK-mediated NGF signaling in the rat septo-hippocampal pathway diminishes with age. *Psychopharmacology*. 2006;188(4):605-18.
- Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J*. 1990;9(8):2431-8.
- Wu WM, Lin BF, Su YC, Suen JL, Chiang BL. Tamoxifen decreases renal inflammation and alleviates disease severity in autoimmune NZB/W F1 mice. *Scand J Immunol*. 2000;52(4):393-400.
- Xie Q, Guan J, Wu G, Xi G, Keep RF, Hua Y. Tamoxifen treatment for intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;111:271-5.
- Xu P, Rosen KM, Hedstrom K, Rey O, Guha S, Hart C, Corfas G. Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia*. 2013;61(7):1029-40.
- Yan XB, Hou HL, Wu LM, Liu J, Zhou JN. Lithium regulates hippocampal neurogenesis by ERK pathway and facilitates recovery of spatial learning and memory in rats after transient global cerebral ischemia. *Neuropharmacology*. 2007;53(4):487-95.
- Yasuda S, Liang MH, Marinova Z, Yahyavi A, Chuang DM. The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol Psychiatry*. 2009;14(1):51-9.
- Yildiz A, Guleryuz S, Ankerst DP, Ongur D, Renshaw PF. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania: a double-blind, placebo-controlled trial of tamoxifen. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(3):255-63.
- Yuskaitis CJ, Joep RS. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity. *Cell Signal*. 2009;21(2):264-73.
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Quiroz J, Jolkovsky L, Luckenbaugh DA, Manji HK. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord*. 2007;9(6):561-70.
- Zarate CA, Manji HK. Protein kinase C inhibitors: rationale for use and potential in the treatment of bipolar disorder. *CNS Drugs*. 2009;23(7):569-82.

Zhang P, Katz J, Michalek SM. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) inhibition suppresses the inflammatory response to *Francisella* infection and protects against tularemia in mice. *Mol Immunol.* 2009;46(4):677-87.

Zhao Y, Altman BJ, Coloff JL, Herman CE, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Dimascio LN, Ilkayeva O, Kelekar A, Reya T, Rathmell JC. Glycogen synthase kinase 3 α and 3 β mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4328-39.

Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S414-6.

ANEXO



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 045/2013

Professor Responsável: Tatiana Barichello.

Equipe: Ana Paula Moreira, Caroline Silva da Costa, Cleonice Michelin, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Renan Antônio Ceretta e Samuel Galvão Elias.

Título: "Avaliação dos efeitos do lítio e tamoxifeno sobre a cascata da plasticidade celular em ratos submetidos à meningite pneumocócica."

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 240 Ratos Wistar 60 250 – 300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 045/2013

Principal Investigator: Tatiana Barichello.

Researchers: Ana Paula Moreira, Caroline Silva da Costa, Cleonice Michelin, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Renan Antônio Ceretta e Samuel Galvão Elias.

Project title: "Assessment of the effects of lithium and tamoxifen on the cascade of cellular plasticity in rats submitted to pneumococcal meningitis.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesp.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesp.net.

Criciúma, 28 de maio de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação dos efeitos do lítio sobre parâmetros neuroquímicos e comportamentais em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica” Protocolo nº 074/2015-1 sob a responsabilidade de Josiane Budni e equipe: Tatiana Barichello, Ana Paula Moreira, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Renan Antônio Ceretta, Cássia Pereira Rafael, Cristiano Julio Faller, Rodrigo Ferreira Valim, Jessica de Assis Goulart, Paulo Eduardo Aveline, Michael Hikaro Tashiro, Gustavo Sangiogo da Silva, Allan Minatto Collodel, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 15/06/2015.

Vigência do Projeto	03/08/2015 a 30/05/2017
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus albinus Wistar
Nº. De animais	589
Peso/Idade	250g a 300g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 074/2015-1

Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: Tatiana Barichello, Ana Paula Moreira, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Renan Antônio Ceretta, Cássia Pereira Rafael, Cristiano Julio Faller, Rodrigo Ferreira Valim, Jessica de Assis Goulart, Paulo Eduardo Aveline, Michael Hikaro Tashiro, Gustavo Sangiogo da Silva, Allan Minatto Collodel

Project title: Evaluation of the effects of Lithium on neurochemical and behavioral parameters in adult Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 16 de junho de 2015.

JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA